

文章编号:1005-6947(2005)02-0149-03

· 简要论著 ·

白藜芦醇对肝脏缺血再灌注损伤的保护作用

孙水平¹, 孙中杰¹, 吴胜利², 于良²

(1. 陕西省人民医院 肝胆外科, 陕西 西安 710068; 2. 西安交通大学第一医院 肝胆外科, 陕西 西安 710061)

摘要:探讨白藜芦醇对肝脏缺血再灌注损伤的防护作用。将雄性 SD 大鼠随机分为空白对照组、缺血再灌注组(I/R组)、I/R加生理盐水处理组和I/R加白藜芦醇处理组。观察肝脏缺血40 min再灌注1, 3, 6, 12 h后血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)及肝组织丙二醛(MDA)含量的变化以及肝组织病理学改变。结果示肝脏I/R后血清ALT, AST及肝组织MDA含量均显著升高, 肝脏缺血再灌注前用白藜芦醇15 mg/kg者, 血清ALT, AST及肝组织MDA含量均明显降低, 且肝组织病理学损害明显减轻。结果表明白藜芦醇对肝脏I/R损伤具有保护作用。

关键词:肝缺血; 再灌注损伤; 白藜芦醇/治疗应用

中图分类号:R657.32; R619.9

文献标识码:B

肝脏缺血再灌注损伤是肝移植、肝叶切除手术过程中常涉及的共同的病理生理变化。近年来, 随着肝移植临床技术的日益成熟, 对提高手术患者存活率及延长存活时间的要求越来越高, 因此防治围手术期肝脏缺血再灌注损伤的研究十分重要^[1,2]。本实验选用白藜芦醇(resveratrol, RES), 观察肝脏缺血再灌注后血清中谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)和肝组织中丙二醛(MDA)含量的变化以及肝组织的病理学变化, 探讨白藜芦醇是否具有保护肝细胞功能, 减轻肝脏缺血再灌注损伤的作用。

1 材料与方 法

1.1 动物与试剂

健康成年雄性SD大鼠116只, 体重180~220 g, 由西安交通大学实验动物中心提供; MDA试剂盒由南京建成生物工程研究所提供; 白藜芦醇购自美国Sigma公司。

1.2 分组及模型制作

动物术前12 h禁食, 自由进水, 10%乌拉坦腹腔注射麻醉(1 g/kg)。取上腹正中切口, 入腹后显露第一肝门部, 用动脉夹夹闭肝门, 40 min后开放。

将动物随机分为4组:(1)缺血再灌注组($n = 32$), 阻断入肝血流40 min后松开无创动脉夹, 恢复入肝血流; 于所需时相点活杀动物取材。(2)I/R加生理盐水处理组(NS组, $n = 32$), 阻断入肝血流前10 min自尾静脉注射生理盐水1.5 mL; 其他同缺血再灌注组。(3)I/R加白藜芦醇处理组(RES组, $n = 32$), 阻断入肝血流前10 min自尾静脉注射2 mg/mL的RES 1.5 mL(约3 mg, 15 mg/kg); 其余同缺血再灌注组。(4)空白对照组($n = 20$), 仅作开腹手术, 不作肝门阻断。各组均于再灌注后(空白对照组于手术结束后)1, 3, 6, 12 h采血和肝组织待检。

1.3 指标测定方法

(1)血清ALT, AST的含量用常规生化方法测定。(2)肝组织中MDA含量的测定: 切取肝脏活组织约100 mg, 加入1 mol/L的HCl 1 mL, 碾磨后100℃水浴10 min, 匀浆, 4℃下3 000 r/min离心10 min, 取上清液。按MDA试剂盒说明书用硫代巴比妥酸比色法测定肝组织中MDA含量。(3)肝组织病理学处理和观察: 10%甲醛溶液固定新鲜肝组织, 按病理学常规制片, HE染色, 光学显微镜观察。

1.4 统计学处理

实验所得数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示; 组间比较用 t 检验。

收稿日期:2004-10-06; 修订日期:2004-12-03。

作者简介:孙水平(19-), 男, 陕西西安人, 陕西省人民医院副主任医师, 主要从事肝脏肿瘤方面的研究。

通讯作者:孙水平 电话:029-85261331-2581, 13909222879(手机); E-mail:Sunzhongjie@21cn.com。

2 结果

2.1 血清 ALT 含量的变化

各实验组血清 ALT 于缺血再灌注后第 6 h 达高峰,再灌注后 12 h 仍维持在较高水平;与正常组比较,差异均有极显著性($P < 0.01$)。RES 组血清 ALT 含量较缺血再灌注组及 NS 组低,差异有显著性($P < 0.05$)(表 1)。

2.2 血清 AST 含量的变化

各实验组血清 AST 于缺血再灌注后第 6 h 达高

峰,再灌注后 12 h 仍维持在较高水平;与正常组比较,差异均有极显著性($P < 0.01$)。RES 组血清 AST 含量较缺血再灌注组及 NS 组低,差异有显著性($P < 0.05$)(表 2)。

2.3 肝组织中 MDA 含量的变化

各组肝组织中 MDA 含量于缺血再灌注后增加,第 3 h 达高峰,第 12 h 基本接近正常水平;与正常组比较,差异均有极显著性($P < 0.01$)。RES 组肝组织中 MDA 含量较缺血再灌注组及 NS 组低,差异有显著性($P < 0.05$)(表 3)。

表 1 肝缺血再灌注时血清 ALT 含量的变化($\bar{x} \pm s$, U/L)

组别	n	再灌注 1h	再灌注 3h	再灌注 6h	再灌注 12h
正常	20	24.8 ± 3.1	27.4 ± 5.2	26.4 ± 2.9	23.4 ± 5.0
缺血再灌注	32	142.6 ± 21.6 ¹⁾	173.5 ± 25.31)	187.5 ± 21.6 ¹⁾	135.4 ± 18.2 ¹⁾
NS	32	137.7 ± 20.8 ¹⁾	183.1 ± 31.4 ¹⁾	185.6 ± 23.7 ¹⁾	140.4 ± 22.1 ¹⁾
RES	32	76.9 ± 11.2 ^{1),2)}	86.5 ± 13.4 ^{1),2)}	99.5 ± 10.3 ^{1),2)}	94.6 ± 12.9 ^{1),2)}

注:1)与正常组相比, $P < 0.01$;2)分别与缺血再灌注组及 NS 组相比, $P < 0.05$

表 2 肝缺血再灌注时血清 AST 含量变化($\bar{x} \pm s$, U/L)

组别	n	再灌注 1h	再灌注 3h	再灌注 6h	再灌注 12h
正常	20	28.9 ± 4.1	36.4 ± 7.1	28.6 ± 3.9	23.0 ± 4.6
缺血再灌注	32	146.1 ± 15.7 ¹⁾	166.6 ± 23.21)	205.4 ± 37.2 ¹⁾	189.3 ± 29.2 ¹⁾
NS	32	165.8 ± 20.4 ¹⁾	168.3 ± 29.7 ¹⁾	177.6 ± 21.7 ¹⁾	172.5 ± 28.4 ¹⁾
RES	32	86.5 ± 16.8 ^{1),2)}	87.4 ± 12.4 ^{1),2)}	109.3 ± 16.4 ^{1),2)}	104.6 ± 18.8 ^{1),2)}

注:1)与正常组相比, $P < 0.01$;2)分别与缺血再灌注组及 NS 组相比, $P < 0.05$

表 3 肝缺血再灌注时肝组织 MDA 含量的变化($\bar{x} \pm s$, nmol/mg 蛋白质)

组别	n	再灌注 1h	再灌注 3h	再灌注 6h	再灌注 12h
正常	20	0.491 ± 0.024	0.488 ± 0.029	0.502 ± 0.039	0.501 ± 0.036
缺血再灌注	32	1.396 ± 0.365 ¹⁾	2.872 ± 0.216 ¹⁾	2.013 ± 0.347 ¹⁾	0.758 ± 0.051
NS	32	1.241 ± 0.2841)	2.645 ± 0.408 ¹⁾	1.865 ± 0.357 ¹⁾	0.637 ± 0.045
RES	32	0.832 ± 0.155 ^{1),2)}	1.423 ± 0.354 ^{1),2)}	1.203 ± 0.031 ^{1),2)}	0.654 ± 0.023

注:1)与正常组相比, $P < 0.01$;2)分别与缺血再灌注组及 NS 组相比, $P < 0.05$

2.4 肝细胞形态学改变

光镜下正常对照组肝细胞及肝窦内皮细胞均正常。缺血再灌注组和 NS 组再灌注后 1 h 肝脏瘀血即明显,以门静脉为中心向周边呈放射状排列,同时可见不同程度的肝细胞肿胀、脂肪空泡变,偶可见灶性坏死;12 h 时则主要以肝细胞局灶性及片状坏死为主。RES 组再灌注后 1~6 h 肝脏的瘀血明显较缺血再灌注组及 NS 组轻,细胞变性坏死不明显,12 h 偶可观察到点状坏死,无成片状细胞坏死。

3 讨论

目前认为,缺血再灌注开始后肝脏的损伤是由多种机制之间相互作用的结果,如氧自由基的大量产生、细胞内 Ca^{2+} 超载、中性粒细胞的活化、乳酸等代谢产物堆积以及蛋白水解酶活性增加等^[3-5]。再灌注早期阶段,内皮细胞肿胀、血管收缩、白细胞停滞、血小板在血窦内聚集导致微循环

衰竭。由于缺血导致能量缺乏随之跨膜转运活性的丧失,一氧化氮(NO)和内皮素间的精细平衡被打破,引起血管收缩、血窦腔变细伴有白细胞移动速率下降。白细胞与内皮细胞接触频率上升,促进白细胞停滞,进一步导致肝脏微循环血窦网中的血流障碍。这样使得再灌注开始后保持缺血区的肝脏的低氧期延长,最终使库普弗细胞和中性粒细胞激活,产生炎症细胞因子和氧自由基。大量氧自由基由于其极高的化学活性,可攻击大分子诸如核酸、蛋白质、脂质和细胞膜,造成膜脂质过氧化损害,从而加重肝脏的损害^[6~8]。

RES 化学名称为 3,5,4'-三羟基苯二烯,是一类主要存在于葡萄、藜芦、虎杖等植物中的多酚类化合物。对 RES 生物学功能的研究提示,RES 对缺血再灌注导致的组织损伤具有潜在的保护作用。包括:(1)抗炎作用。RES 能抑制环氧化酶(COX)活性^[9],减少白三烯(LTs),血栓素 B2(TXB2),5-羟基二十碳四烯酸(5 HETE)生成;抑制核转录因子 κ B(NF- κ B)激活,减少细胞因子形成^[10]。(2)增加 SOD,谷胱甘肽过氧化物酶活性,减少自由基和脂质过氧化^[11]。(3)抑制血小板聚集^[12]。RES 能减少血小板生成血栓素 A2(TXA2),抑制 ADP 和凝血酶诱导的聚集。(4)引起血管舒张^[13]。RES 增加 NO 和腺苷释放,对慢性缺血组织起保护作用。

本研究中缺血再灌注组、NS 组和 RES 组在缺血再灌注 1 h 后,血清 AST,ALT 及肝组织 MDA 的含量均较正常组明显升高,其中 AST,ALT 含量在再灌注后第 6 h 达高峰,在再灌注后 12 h 仍维持在较高水平,肝组织 MDA 含量在再灌注后第 3 h 达高峰,再灌注后 12 h 基本接近正常水平。与正常组比较,差异均有极显著性($P < 0.01$)。此外,与缺血再灌注组及 NS 组相比,RES 组中血清 AST,ALT 及肝组织 MDA 含量又存在统计学差异,RES 组中此 3 项指标含量明显低于前 2 组($P < 0.05$)。镜下结构变化也显示 RES 组肝脏的瘀血程度、细胞变性、坏死的程度和范围均较缺血再灌注组及 NS 组为轻。此结果提示 RES 能明显促

进肝功能恢复,改善肝脏显微结构,对成年大鼠肝脏的缺血再灌注损伤有良好的保护作用。RES 广泛存在于种子植物之中,来源丰富,有较高的使用安全性,RES 在临床肝脏手术领域将有广泛的应用前景,对其作用和机制的研究尚在进行之中。

参考文献:

- [1] Murata R, Hamada N, Nakamura N, *et al.* Serotonin activity and liver dysfunction following hepatic ischemia and reperfusion [J]. *In Vivo*, 2003, 17(6):567-572.
- [2] Ijaz S, Yang W, Winslet MC, *et al.* Impairment of hepatic microcirculation in fatty liver [J]. *Microcirculation*, 2003, 10(6):447-456.
- [3] 徐迅迪,黄生福,胡继雄,等.肌红蛋白的表达对肝缺血再灌注损伤的保护作用[J].中国普通外科杂志,2004,13(9):658-660.
- [4] 赵卫红,张有成,李徐生,等.大黄素对肝脏缺血-再灌注损伤的保护作用[J].中国普通外科杂志,2004,13(8):594-597.
- [5] 吴刚,刘永锋,成东华,等.己酮可可碱对肝脏缺血再灌注损伤保护作用的实验研究[J].中国普通外科杂志,2004,13(5):353-356.
- [6] Shimono H, Goromaru T, Kadota Y, *et al.* Propofol displays no protective effect against hypoxia/reoxygenation injury in rat liver slices [J]. *Anesth Analg*, 2003, 97(2):442-448.
- [7] Woodside KJ, Song J, Song W, *et al.* Immunomodulation of hepatic ischemic injury via increased Bel-X(L) and decreased Bel-X(S) [J]. *J Surg Res*, 2003, 112(1):59-64.
- [8] Lehmann TG, Wheeler MD, Froh M, *et al.* Effects of three superoxide dismutase genes delivered with an adenovirus on graft function after transplantation of fatty livers in the rat [J]. *Transplantation*, 2003, 76(1):28-37.
- [9] Chung EY, Kim BH, Lee MK, *et al.* Anti-inflammatory effect of the oligomeric stilbene alpha-viniferin and its mode of the action through inhibition of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase [J]. *Planta Med*, 2003, 69(8):710-714.
- [10] Murakami A, Matsumoto K, Koshimizu K, *et al.* Effects of selected food factors with chemopreventive properties on combined lipopolysaccharide- and interferon-gamma-induced IkappaB degradation in RAW264.7 macrophages [J]. *Cancer Lett*, 2003, 195(1):17-25.
- [11] Lee SE, Shin HT, Hwang HJ, *et al.* Antioxidant activity of extracts from *Alpinia katsumadai* seed [J]. *Phytother Res*, 2003, 17(9):1041-1047.
- [12] Shigematsu S, Ishida S, Hara M, *et al.* Resveratrol, a red wine constituent polyphenol, prevents superoxide-dependent inflammatory responses induced by ischemia/reperfusion, platelet-activating factor, or oxidants [J]. *Free Radic Biol Med*, 2003, 34(7):810-817.
- [13] Liu JC, Chen JJ, Chan P, *et al.* Inhibition of cyclic strain-induced endothelin-1 gene expression by resveratrol [J]. *Hypertension*, 2003, 42(6):1198-1205.